

褐藻ウミトラノオ(*Sargassum thunbergii*)由来のヒト外毛根鞘細胞増殖促進物質MC32の単離と活性

誌名	Coastal bioenvironment
ISSN	13487175
著者名	平栗,良介 井田,達也 亀井,勇統
発行元	佐賀大学海浜台地生物環境研究センター
巻/号	2巻
巻号補足	
掲載ページ	p. 77-84
発行年月	2003年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



褐藻ウミトラノオ (*Sargassum thunbergii*) 由来のヒト外毛根鞘細胞増殖促進物質 MC32 の単離と活性

Isolation and activity of a growth stimulating substance, MC32 from a marine brown alga, *Sargassum thunbergii* for outer root sheath cells

平栗 良介 ・ 井田 達也 ・ 亀井 勇統

佐賀県唐津市松南町 152-1 佐賀大学海浜台地生物環境研究センター

Ryosuke HIRAGURI, Tatsuya IDA and Yuto KAMEI

Coastal Bioenvironment Center, Saga University, 152-1 Shonan-cho, Karatsu, Saga 847-0021, Japan

要 約

我々は、これまでに海藻成分由来の新規育毛剤の開発を目的に、日本沿岸より採取した計 338 種の海藻を対象に、毛髪成長に重要なヒト外毛根鞘細胞に対する増殖促進活性のスクリーニングを行い、その結果についてはすでに報告している。本研究では、先のスクリーニングにおいて活性を示した海藻の中で比較的強い活性を示した褐藻ウミトラノオを選抜してヒト外毛根鞘細胞に対する増殖促進物質の分離・精製を試みた。

その結果、湿重量 200 g のウミトラノオより各種クロマトグラフィーを用いてヒト外毛根鞘細胞増殖促進物質 MC32 を 1.2 mg 得た。MC32 は、ヒト外毛根鞘細胞に対して 133% の増殖促進活性を示し、C3H マウスを用いた *in vivo* における育毛効果試験においては、既存の育毛剤の有効成分であるミノキシジルと同等の活性を示した。さらには、正常ヒト線維芽細胞に対して極めて低毒性の化合物であることが明らかとなった。このことより、MC32 は新規育毛剤への開発に有望であることが示唆された。

Summary

We previously reported the screening of 338 species of marine algae collected in Japan coasts for growth stimulating activity of human outer root sheath cells (hORSc) in order to develop new hair growth stimulating agents. In this study, we attempted to isolate and purify hORSc growth stimulating substance from a marine brown alga, *Sargassum thunbergii* which showed high growth stimulating activity.

A 1.2 mg of hORSc growth stimulating substance, MC32 was isolated from the MeOH extract of 200 g wet weight of *S. thunbergii* by using various chromatographies. MC32 showed 133% growth stimulating activity to hORSc. In evaluating the hair fostering effect in C3H mice, the activity of MC32 was almost equivalent to minoxidil as positive control, which is an ingredient in a commercial hair growth product. Furthermore, it showed low cytotoxicity to human dermal fibroblasts.

These results suggested that MC32 may be a new effective component in hair growth agent.

緒 言

毛髪は死細胞の集まりであるにもかかわらず、体表から熱が逃げるのを防ぎ、物理的、化学的刺激や太陽の紫外線・輻射熱から体を守り、様々な色や模様を生み出すなど、多彩な機能を持っている。しかしながら、近年人を取り巻く様々な生活環境の変化から脱毛・若ハゲ・薄毛に悩む人々が増加しており、しかも若年化の傾向にある。今後高齢化が進む一方で、若年層を中心とした髪ファッションに対する意識の向上や変化等の影響で、より有効な育毛・発毛剤の開発が求められてくると考えられる。現在までに、多くの植物由来物質が伝統的に育毛剤として用いられてきたが、ほとんどの物質は、治療的というよりはむしろ、抗炎症作用や抗菌作用により肌を健康に保つものとして用いられてきた。現在市販されている育毛剤の多くにはビタミン類、アミノ酸類、抗炎症剤、男性ホルモン拮抗剤、殺菌剤、保湿剤、生薬類や植物成分等が使用されている。しかしながら、これらの有効成分の大半は毛髪に対する直接的な育毛効果ではなく、血行促進作用や皮脂分泌抑制作用等の二次的な効果が期待されているものばかりである。一方、市販の発毛剤としては、現在までのところ、当初降圧剤として開発され、偶然的に臨床試験で副作用として多毛が認められたミノキシジルを有効成分とした製品が販売されているのみである。

このような状況下、毛髪研究は著しく進歩しており、ヒトの毛乳頭細胞 (Messenger, 1984) や外毛根鞘細胞 (Arase, 1991) 等の毛包構成細胞の培養が可能となったことで、毛髪の成長に関与している多くの因子が解明され、遺伝子レベルでの研究も進んでいる。現在、いくつかの物質に、直接的に毛髪成長を促すことが知られており、植物由来ではない物質の毛髪成長促進効果が集中的に解明され、活性成分として確認されている。さらに、多くの企業および大学で新規の育毛・発毛剤の開発を目的として男性ホルモンを代表とする毛髪成長抑制因子の働きを阻害する物質、または直接毛包構成細胞を活性化させ毛髪の成長を増進させる物質のスクリーニングが行われており、マウスを用いた *in vivo* 試験も進められている。近年では、ヒト外毛根鞘細胞不死化細胞株が樹立

され、大量のサンプルを対象とした毛髪成長を増進する物質のスクリーニングが可能となっている (Suzuki, 2000)。外毛根鞘細胞は毛包上皮に存在し、詳細なメカニズムは十分には解明されていないものの、毛乳頭細胞との相互作用により細胞の増殖は毛周期および毛髪の成長に深く関与していると考えられている (板見, 1999; 山本, 1999)。

一方、この様な中、海藻類は古来より食品、医薬品として様々な効能が報告され、未知の部分が多い海洋生物資源の一つであり、新規有用生理活性物質を求めるのに極めて有望であると考えられている。そこで、我々は海藻成分を用いた新規の育毛・発毛剤の開発を目的として、日本沿岸より採取した計 338 種の海藻を対象に、毛包構成細胞の 1 つである外毛根鞘細胞増殖促進活性のスクリーニングを行った結果、3 種の海藻の PBS 抽出液並びに 21 種の海藻の MeOH 抽出液に、ヒト外毛根鞘細胞に対して 120% 以上の増殖促進活性を認めている (井田, 2000)。

そこで本研究では、これらの中でも比較的高い活性を示し、量の確保が容易な褐藻ウミトラノオの MeOH 抽出液より、ヒト外毛根鞘細胞増殖促進物質の分離・精製を試み、単離した活性物質 MC32 の細胞増殖促進活性ならびに細胞毒性等を検討し、その有効性について評価したので報告する。

材料および方法

【海藻抽出液】

本研究では、先のスクリーニングの結果に基づき、2003 年 4 月に佐賀県波戸岬にて採取した褐藻ウミトラノオを用い、これまでに報告した方法 (井田ら, 2000) により MeOH 抽出液を調製した。

【供試細胞および培地】

ヒト外毛根鞘細胞 (hORSc) は、株式会社 資生堂ライフサイエンス研究センター 皮膚科学研究所より分与された。hORSc の培養は 0.01% コラーゲン溶液 タイプ 1 (機能性ペプチド研究所) を細胞接着面に広げ、2 時間静置後、等量の PBS で 3 回洗浄を行ってコーティングしたフラ

スコを用いた。培地は 10% の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) を添加した E-RDF 培地 (pH 6.8, Kyokuto) を用いて、5% CO₂ 下 37℃ で培養した。

【hORS細胞増殖促進活性の評価】

96-well プレートは各 well にコラーゲン溶液 タイプ I (機能性ペプチド研究所) を 100 μ l 添加して、2 時間静置後、等量の PBS で 3 回洗浄を行ってコーティングした。hORSc (2×10^3 cells/well) を 96-well プレートに 100 μ l ずつ播種し、細胞の接着のため 24 時間培養した。24

時間培養後、各供試サンプルを 1% 含むように調製した培地 (1% FBS添加 E-RDF-DMEM 混合培地, 1:1) に交換し、さらに 48 時間培養を行った。培養後、各wellに 5 mg/ml MTT 液 (Sigma - Aldrich) を 10 μ l 加え 4 時間反応後、10% SDS (0.01 N HCl) 細胞溶解溶液を各 well に 100 μ l 加え、生成物を完全に溶出後、マイクロプレートリーダー (model 450, Bio-Rad) で吸光値 (570nm - 655nm) を測定し、以下に示す計算式で、海藻抽出液溶媒添加の陰性対象を 100% とし、hORS 細胞増殖促進活性を評価した。

$$\text{細胞増殖促進活性 (\%)} = \frac{\text{検体を添加した培地の吸光値}}{\text{陰性対象の培地の吸光値}} \times 100$$

【hORS細胞増殖促進物質の単離】

前述した方法により調製した MeOH 抽出液 800 ml に、等量の蒸留水 (v/v) を加えて混合後、2 倍量の *n*-Hexane により溶媒分配を行った。高い hORSc 増殖促進活性の見られた *n*-Hexane 層を回収し、ロータリーエバポレーターにより濃縮後、順次 *n*-Hexane/Ethyl Acetate/Acetone = 8/1/1, 5/1/1, 3/4/1, MeOH = 100% を展開溶媒としてシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 33 \times 400$ mm; Silica gel 60, Merck) に供した。最も高い活性の見られた画分を、順次 MeOH/H₂O = 6/4, 7/3, 8/2, 9/1, 10/0 を展開溶媒としてコスモシルカラムクロマトグラフィー ($\phi 20 \times 200$ mm; Cosmosil 75 C - 18 - OPN, Nacalaitesque) に供した。以上のステップを経て得られた hORSc 増殖促進活性画分は、最終的に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供することによって精製した。hORSc 増殖促進物質の分取は、Mightysil RP-18 GP カラム ($\phi 4.6 \times 250$ mm, Kanto Chemical) を用い、30 ~ 100% の Acetonitrile/H₂O の濃度勾配により、流速 1.0 ml/min で溶出させ、最終的に hORSc 増殖促進物質を得た。

【MC32の熱安定性試験】

熱安定性試験は、MC32 を 1.56 μ g/ml の濃度になるよう DMSO を用いて調製した後に、1.5

ml のマイクロチューブに分注し、それぞれ 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 および 100℃ で 10 分間、あるいは 121℃ で 20 分間加熱処理後、直ちに冷却して、前述の方法に従い、hORSc 増殖促進活性を評価することにより行った。

【MC32 の pH 安定性試験】

pH 安定性試験は、MC32 を MeOH に溶解後、0.1M クエン酸-第 2 リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2 ~ 8) および 0.1M グリシン緩衝液 (pH 9 ~ 11) にそれぞれ溶解後、30 分間静置して、さらに中和後、1.56 μ g/ml の濃度における hORSc 増殖促進活性を評価することにより行った。

【MC32 の細胞毒性試験】

細胞毒性試験は、正常ヒト線維芽細胞 (Human dermal fibroblasts, HDF; 森永生科学研究所) を用いて、MTT 法により行った。HDF を 96-well プレートに 5×10^3 cells/100 μ l/well の密度で播種し、MeOH に溶解させた MC32 を 1% (終濃度 0.39 ~ 200 μ g/ml) になるよう添加後、72 時間培養を行った。培養後、各 well に 5 mg/ml MTT 液 (Sigma - Aldrich) を 10 μ l 加え 4 時間培養後、10% SDS (0.01N HCl) 細胞溶解溶液を各 well に 100 μ l 加え、生成物を完全に溶出させた。マイクロプレートリーダー (model 450, Bio-Rad) で吸光値 (570nm -

655nm) を測定し、以下に示す計算式を用いて細胞増殖率を算出し、溶解溶媒添加の陰性対象を

100% として評価した。

【MC32 の *in vivo* 育毛効果試験】

$$\text{細胞増殖率 (\%)} = \frac{\text{検体処理した培地の吸光値}}{\text{陰性対象の培地の吸光値}} \times 100$$

MC32 の *in vivo* における育毛効果は、精製した MC32 を用いて行った。まず 6 週齢の雄性 C3H/He マウス（日本クレア）を固形飼料（日本クレア）および水道水を自由摂取させて飼育した。2 週間予備飼育後、試験マウスの背部を注意深くバリカンで剃毛し、剃毛部位に検体を毎日 50 μ l ずつ塗布した。本試験では、MC32 については 0.2% (w/v)、陰性対照として 70% EtOH を、また陽性対照として 70% EtOH に溶解させた 2% ミノキシジル（Wako）(w/v) を供試して、それら 3 試験区について、それぞれ 1 群あたり 5 匹のマウスを用いて行った。育毛効果の評価は、剃毛したばかりの皮膚が、淡桃色から毛の成長により灰色化し、さらに毛の発生

への変化を観察することによって行った。

結 果

【hORSc 増殖促進物質 MC32 の単離】

湿重量 200 g の褐藻ウミトラノオより調製した MeOH 抽出液 800 ml に対して、hORSc 増殖促進活性を指標に、溶媒分配、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（図1）、コスモシルカラムクロマトグラフィー（図2）並びに HPLC（図3）によりヒト外毛根鞘細胞増殖促進物質の単離を試み、活性物質 MC32 を 1.2 mg 得た。

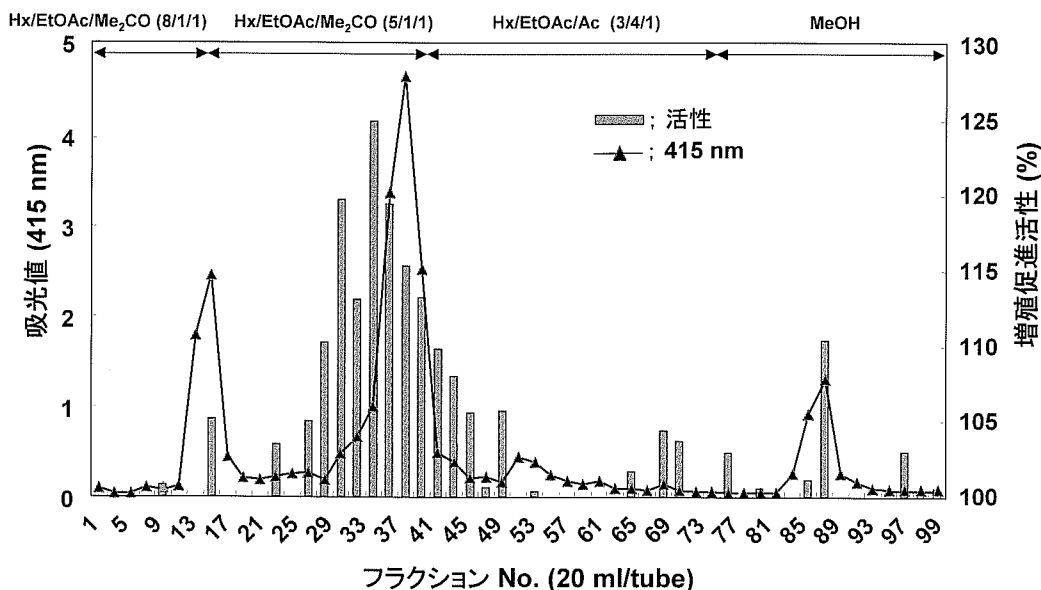


図1. 褐藻ウミトラノオのヘキサン層のヒト外毛根鞘細胞増殖促進画分のシリカゲルカラムクロマトグラフィー

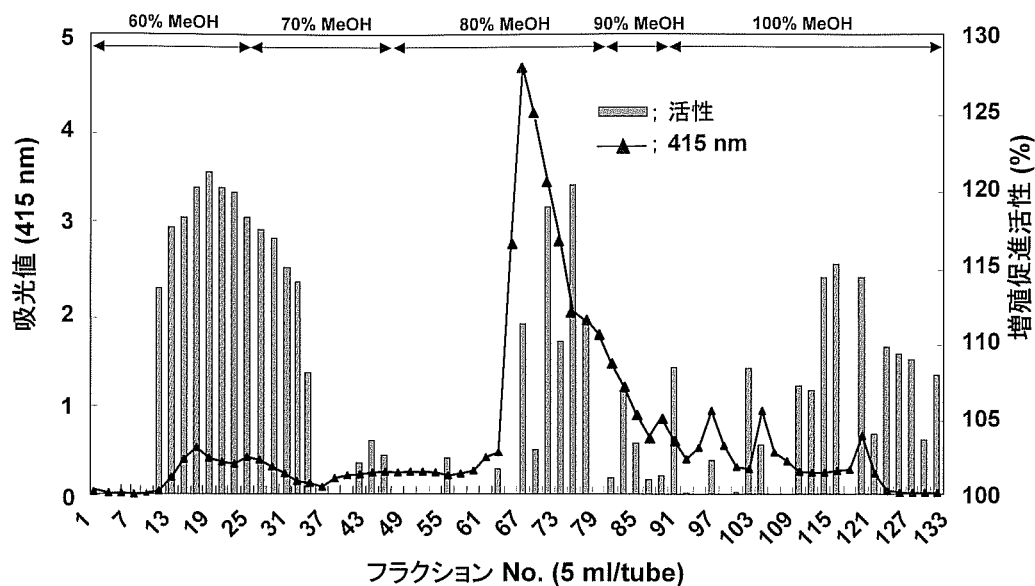


図2. シリカゲルカラムクロマトグラフィー後のウミトラノオ由来活性画分のコスモシルカラムクロマトグラフィー

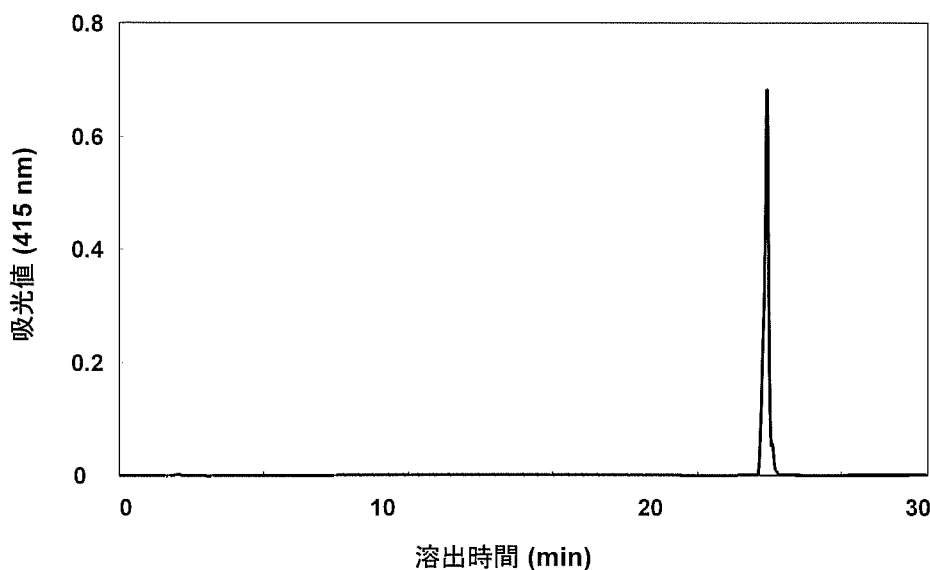


図3. コスモシルカラムクロマトグラフィー後のウミトラノオ由来活性画分の HPLC プロファイル

【MC32 の *in vitro* hORSc 増殖促進活性】

MC32 の *in vitro* における hORSc 増殖促進活性について、0.39 ~ 200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度域において試験を行ったところ、200 $\mu\text{g/ml}$ においては、細胞の増殖率が陰性対象と比較して 67% と低下し、弱い毒性が観察されたが、1.56 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においては、133% の hORSc 増殖促進活性が観察された (図4)。

【MC32 の安定性】

hORSc に対する増殖促進活性を指標にしてその熱および pH に対する安定性を試験した結果、MC32 は、加熱処理によって失活する傾向が観察され (図5)、50℃ 以上の温度では不安定な物質であることが明らかとなった。また、pH に対しては、pH 6 ~ 8 の中性付近で活性の変化はほとんど観察されなかったが (図5)、それ以外の pH 域においては顕著に失活した。

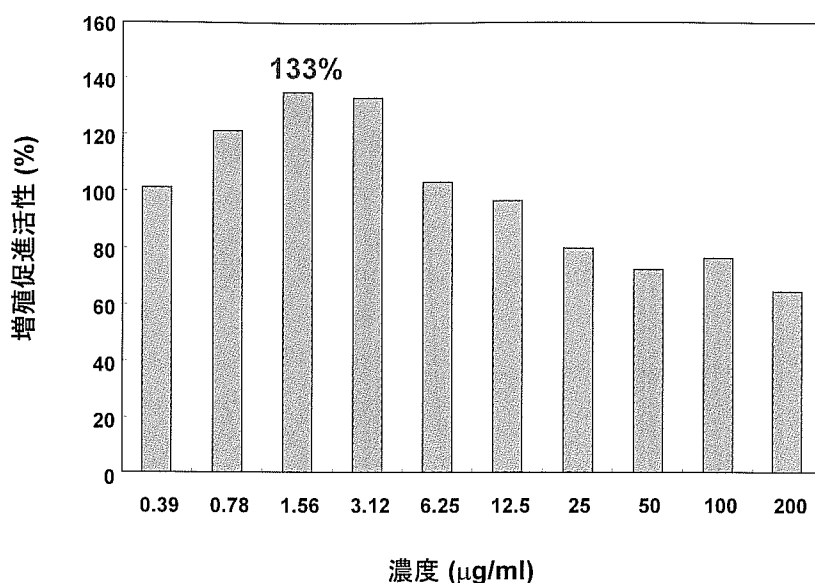


図4. ウミトラノオ由来 MC32 の hORSc 細胞に対する増殖促進活性の濃度依存性

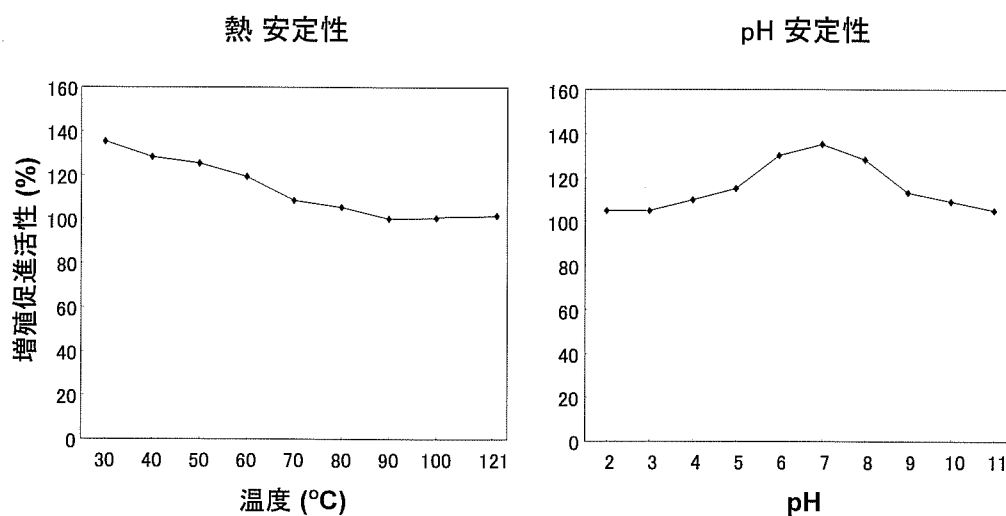


図5. ウミトラノオ由来 MC32 の熱並びに pH に対する安定性

【MC32 の細胞毒性】

MC32 の細胞毒性試験を、正常ヒト線維芽細胞 (HDF) を用いて行った結果、200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においてもほとんど細胞毒性は観察されず、正常細胞に対して毒性の低い物質であることが明らかとなった (図6)。

【MC32のマウス *in vivo* 育毛効果】

剃毛したマウスを用い、その背部に MC32 を塗布して、MC32 の *in vivo* における育毛効果を試験した結果、被験物質の塗布開始後 5 日目に、

陽性対象群にのみ毛髪の発育の徴候が見られたものの (資料には示していない)、15 日目においては陽性対照群において、明らかな毛髪の発育が観察され、MC32 塗布群においても、陽性対照群と比較して若干面積は狭いものの、ほぼ同等の毛の発育が観察された (図7)。したがって、MC32 を塗布した場合、陰性対照とは明らかな育毛効果の違いが観察されたことから、MC32 は、*in vitro* のみならず *in vivo* においても育毛効果を有していることが明らかとなった。

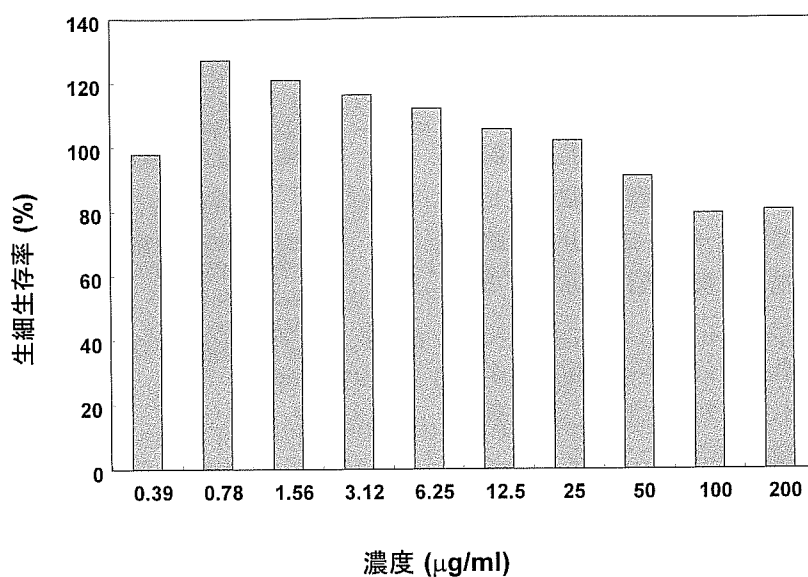


図6. ウミトラノオ由来 MC32 の HDF に対する細胞毒性

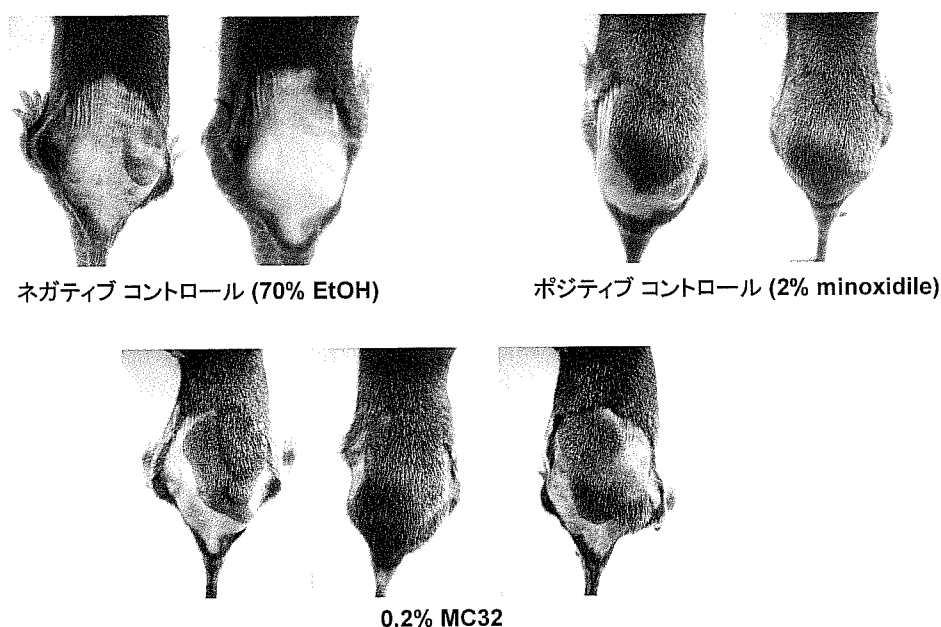


図7. ウミトラノオ由来 MC32 のマウス *in vivo* における塗布開始 15日目 の育毛効果

考 察

近年、毛髪生物学 (ヘアバイオロジー) の研究は大きく様変わりしている。その主な理由は、分子生物学的手法が取り入れられ、毛髪の形成や再生の仕組みを遺伝子や分子のレベルで解明できるようになってきたことにある。

毛髪は成長期、退行期、休止期からなるヘアサイクルを有しており、これは毛包基底部に存在する毛乳頭によって制御されている。また、毛包基

底細胞は外毛根鞘漏斗部の膨隆部に存在することが示されている。ヘアサイクルの成長期の開始においては、まず休止期毛包の毛原基において劇的な有糸分裂誘発が群発すると考えられている。そして、引き続いて外毛根鞘細胞の下方遊走により基底細胞が活性化される。これは成熟した毛包形成に重要であると考えられている。そのため、本研究に用いたヒト外毛根鞘細胞は、毛乳頭細胞によってヘアサイクルの各段階で増殖の制御を受けている。外毛根鞘細胞は成長期においては盛んに

増殖を行い、退行期、さらに休止期に向うにつれ増殖は抑制されていると考えられている（荒瀬，1994）。また男性型脱毛では男性ホルモンが毛髪の成長を抑制しているが³，このとき毛乳頭細胞は男性ホルモンに刺激され，外毛根鞘細胞に対して増殖抑制因子を出している（乾，2000）。このため外毛根鞘細胞の増殖は毛髪の成長に非常に重要であると考えられている。

そこで我々は，これまでに日本沿岸の各地より採取した海藻類 338 種を対象にして，ヒト外毛根鞘細胞に対する増殖促進活性のスクリーニングを行い，MeOH 抽出液では 21 種の海藻，PBS 抽出液では 3 種の海藻に 120% 以上のヒト外毛根鞘細胞増殖促進活性を見出している（井田，2000）。

本研究では，先のスクリーニングにおいて，比較的高い活性を示し，かつ量の確保が容易な褐藻ウミトラノオの MeOH 抽出液より，ヒト外毛根鞘細胞増殖促進物質の単離を試み，活性物質 MC32 を得た。MC32 はヒト外毛根鞘細胞に対して，133% の増殖促進活性を示し，また極めて低毒性の物質であることが明らかとなった。さらに，C3H マウスを用いた *in vivo* 試験においては，既存発毛剤の有効成分であるミノキシジルと比較して，MC32 は 1/10 の濃度でほぼ同等の育毛効果を示した。また，熱や pH に対しても比較的安定な物質であることから，MC32 は育毛剤への応用が有望であることが示唆された。

今後は，単離した MC32 の化学構造の決定を行うとともに，ヒト外毛根鞘細胞増殖促進活性，並びに毛髪成長メカニズムの解析を行い MC32 が，直接外毛根鞘細胞に作用していることから，本物質の新規育毛・発毛剤への開発にむけて今後さらに研究を進める考えである。

参考文献

- 1, 井田 達也, 寺田 竜太, 野呂 忠秀, 亀井 勇統 (2002): 日本沿岸海藻からの *in vitro* におけるヒト外毛根鞘細胞増殖促進活性のスクリーニング, 海と台地, vol.12, 37-44
- 2, 井田 達也 (2002): 日本沿岸海藻由来のヒト外毛根鞘細胞増殖促進物質の検索並びに分離・精製, p 1-79, 佐賀大学大学院農学研究科 修士論文
- 3, Arase S, Sadmoto Y, Katoh S, Urano Y, Takeda K (1990): Co-culture of human hair follicles and dermal papillae in collagen matrix. *J. Dermatol.*, 17, 667-676.
- 4, 荒瀬 誠治 (1994): 毛包の生物学 [3], 西日本皮膚科学会誌, 56 (6), 1182-1186.
- 5, 板見 智 (1990): 毛の発育制御機構解明における最近の進歩と育毛剤, 粧技誌, 33 (3), 220-228.
- 6, 乾 重樹, 板見 智 (2000): 毛乳頭細胞における男性ホルモン作用メカニズムの研究, *Fragrance Journal*, 28 (2), 15-20.
- 7, 松崎 貴, 新井 幸三, 上甲 恭平, 細川 稔, 中村 浩一 (2003): 最新の毛髪科学 p,1-53, フレグランスジャーナル社
- 8, Ayako Kamimura, Tomoya Takahashi (2002): Procyanidin B-3, isolated from barley and identified as a hair-growth stimulant, has the potential to counteract inhibitory regulation by TGF- β 1. *Exp. Dermatology*, 11, 532-541.
- 9, Messenger AG (1984): The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Br. J. Dermatol.*, 110, 685-689.
- 10, Suzuki Jun, Takeoka Eriko, Hamada Chika, Tajima Masayuki, Handa Hiroshi (2000): Immortalization of human hair outer root sheath (hORS) cells with SV40 large T antigen and use for screening of hair growth stimulants. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2000000089 A2* 7 Jan 2000, 18pp.